

银环蛇 (*Bungarus multicinctus*) 毒柱层析分离及其组份的活性测定 和 α -银环蛇毒素的纯化

龚潮梁 孙欣 何其伟
(中国科学院昆明动物研究所)

薛涛云 李淑颜 赵延德
(广州医学院药理学教研室)

摘 要

本文报导了用CM-Sephadex C-50分离广东产银环蛇毒, 得到十三个蛋白组份。测定了九种酶在这些组份中的分布、五个主要毒性组份的神经肌肉阻断作用和小鼠的LD₅₀。小鸡颈二腹肌神经肌肉阻断作用试验表明组分3及组分6显示突触后膜阻断作用, 组分9、组分10及组分11为突触前膜阻断作用。对主要的突触后膜毒素组分3进一步用凝胶过滤和离子交换层析进行纯化, 得到聚丙烯酰胺凝胶电泳纯一的 α -银环蛇毒素。

Chang和Lee[1]用淀粉凝胶电泳分离银环蛇毒得四个组份: 一个突触后神经肌肉阻断成份(α -bungarotoxin)、二个突触前神经肌肉阻断成份 β -bungarotoxin和 γ -bungarotoxin)和一个非毒性组份, 这是首次得到了这两种不同类型的银环蛇神经毒素。其后, Lee等[2]、Mebs等[3]和Dryden等[4]用分离效果更好的离子交换柱层析分离银环蛇毒, 得到8~13个组份, 其中属于 α -型和 β -型毒素的组份都有好几个。由于 α -银环蛇毒素和 β -银环蛇毒素有其独特的作用, 国内许多单位对它们的需要日益迫切, 我们开展了银环蛇毒的柱层析分离及其组份的研究。本文着重报道银环蛇毒的柱层析分离、主要分离组份的活性测定和 α -银环蛇毒素的纯化, 而 β -银环蛇毒素的纯化及其一些性质的测定将在以后另文报道。

材 料 和 方 法

1. 银环蛇毒 由广州医学院药理教研室采集, 取自广东省汕头地区养蛇场的鲜毒经真空干燥制成干粉。

2. CM-Sephadex C-50、Sephadex G-10、Sephadex G-50和Sephadex G-75均为瑞典Pharmacia厂的产品。

3. 银环蛇毒的柱层析分离 400mg银环蛇毒溶于1ml pH5.0, 0.05M, 醋酸铵缓冲液中, 加入用同一缓冲液平衡的CM-Sephadex C-50柱 (1.5×42cm)中, 用平衡缓冲液洗涤后, 再用三个直线盐浓度梯度进行洗脱: (1) 400ml pH5.0, 0.05M醋酸铵缓冲液—400ml pH6.8, 0.5M醋酸铵缓冲液; (2) 300ml pH6.8, 0.5M醋酸铵缓冲液—300ml pH7.0, 0.7M醋酸铵缓冲液; (3) 300ml pH7.0, 0.7M醋酸铵缓冲液—300ml pH7.0, 1M醋酸铵缓冲液。分部收集洗脱液, 每管收集6ml, 20分钟收集一管。洗脱液中的蛋白组份检测是采用测定溶液的280nm光吸收。

4. 凝胶过滤和CM-Sephadex C-50重层析 参照银环蛇毒柱层析分离的条件进行。

5. 酶活力测定 按涂光俦等^[5]发表的方法进行。

6. 小鸡颈二腹肌神经肌肉阻断试验 参照Ginsborg和Warriner^[6]的方法进行。出壳7~14天的小鸡剪开颈部皮肤, 剥离一侧颈二腹肌, 使神经部分长度剥离1cm左右。剪下此神经肌肉标本浸在Krebs-Henseleit溶液中, 通以氧气并维持32°C。用波宽为0.5ms的超强方波刺激神经, 每5秒钟刺激一次。肌肉收缩用等张杠杆描记于烟鼓上。用浓度为4μg/ml的溴化乙酰胆碱引起的肌肉收缩, 待杠杆上升到最高点时换用Krebs-Henseleit溶液洗去乙酰胆碱, 使肌肉恢复正常。用分离纯化的组分作用于标本时, 毒素浓度为2μg/ml, 待完全阻断后再加乙酰胆碱, 观察肌肉是否能再现收缩。以此鉴别β-型毒素与α-型毒素。

7. LD₅₀ 按张昌绍、张毅主编的药理学一书^[7]所介绍的改进的Kärber法进行测定。每个样品采用4~5个剂量组, 每组用18~20g的小鼠10只, 雌雄均可。根据24小时的死亡率进行计算LD₅₀。

8. 聚丙烯酰胺凝胶电泳 采用垂直平板式凝胶电泳, 凝胶板大小为12×8×0.2cm, 浓缩胶浓度为4%, pH4.3, 分离胶浓度为10%或15%, pH6.7, 这二种胶的交联度均为2.6%。电极缓冲液为pH4.5, β-丙氨酸—醋酸缓冲液。电泳时电流恒定为15mA, 电泳3小时。电泳后用50%三氯醋酸固定区带后用考马斯亮兰R₂₅₀染色。

结 果

1. 银环蛇毒用CM-Sephadex C-50柱层析分离后, 所得的层析图谱如图1。

分离得到13个组份, 其中组份1为不吸附峰, 毒性很低。各组份的蛋白总回收率(按280nm的OD数计算)达到85%以上。各组份合并后直接冻干, 得到含盐的干粉。

2. 对13个组分进行了九种酶的活力测定, 寻找各酶的主要分布区域, 测定结果如表1所示:

3. 对13个组份中含量较高的毒性组份3、6、9、10及11五个组份进一步纯化。先用凝胶过滤层析进行纯化, 这些组份含盐的冻干粉溶于少量水中, 组份3及6分别用Sephadex G-50柱(1.6×120cm)进行分离, 组份9、10、11分别用Sephadex G-75柱(1.6×120cm)进行分离, 洗脱液均用pH5.0, 0.5M醋酸铵缓冲液。各组份的分离图形如图2所示:

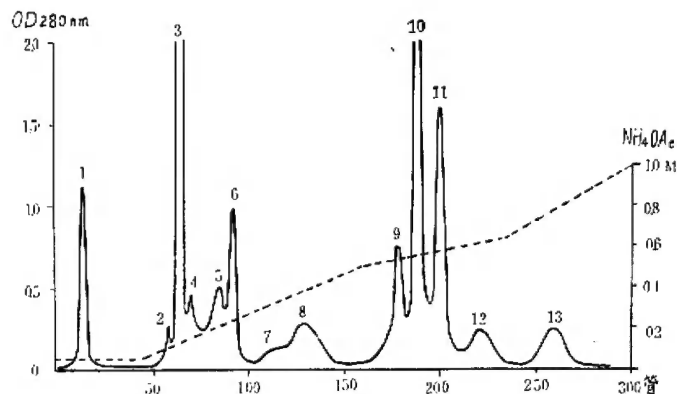


图 1 银环蛇毒的CM-Sephadex C-50柱层析分离图谱

银环蛇毒400mg, CM-Sephadex C-50柱(1.5×42cm) 用pH5.0, 0.01M醋酸铵缓冲液平衡。梯度洗脱, 每小时收集3管, 每管6ml

表 1

银环蛇毒分离组分中九种酶活性的分布

酶	活力分布区域	活力高峰区
L-氨基酸氧化酶	组份 1	
蛋白水解酶	组份 1	
磷酸单酯酶	组份 5、6、7、8、9	组份 8、9
磷酸二酯酶	组份 5、6、7	组份 5、6
磷酸酶 A	组份 3、4、5	组份 3
胆碱酯酶	组份 3、4、5、6	组份 5
5'核苷酸酶	组份 5、6、7、8	组份 9
NAD酶	组份 5、6、7、8	组份 9
精氨酸酯酶	各组份活力均很低	

组份 3、10和11凝胶过滤层析的主峰合并后冻干, 经用Sephadex G-10柱(2.0×95 cm) 脱盐, 溶液再冻干后分别溶于 pH5.0, 0.05M 醋酸铵缓冲液, 再用 CM-Sephadex C-50柱 (1.5×40cm) 分别重层析, 梯度洗脱, 层析图谱如图 3 所示。

重层析后合并其主要组份, 经冻干和用Sephadex G-10柱层析脱盐后, 最后再冻干成干粉。我们把经过以上这样提纯的组份称为提纯的组份3、提纯的组份10和提纯的组份11。

4. 用小鸡颈二腹肌标本测定组份 3、6、9、10、11这五个组份的神经肌肉阻断作用, 实验结果表明组份 3 和组份 6 完全阻断神经传导后, 加入乙酰胆碱未见引起肌肉收缩, 这表明它们是突触后阻断作用的 α -型毒素。组份 9、10和11 在完全阻断神经传导后, 加入乙酰胆碱都引起肌肉收缩, 这表明它们是突触前阻断作用的 β -型毒素。图 4 为提纯的组份 3、6、9、10和11的小鸡颈二腹肌神经肌肉阻断作用描记图。

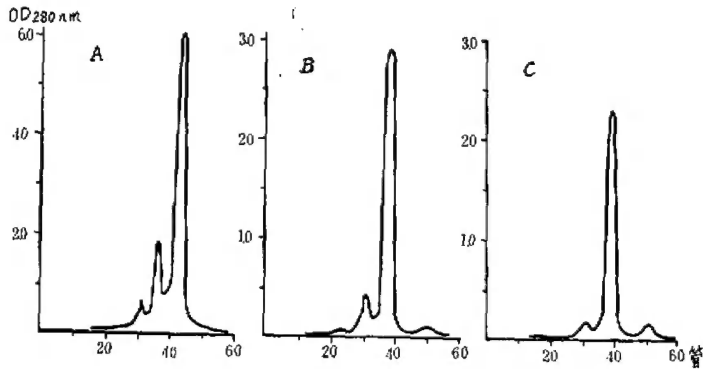


图2 银环蛇毒几个主要组分的凝胶过滤图

A: 组份3含盐干粉143mg, Sephadex G-50柱(1.6×120cm), 每小时收集3管, 每管4.4ml

B: 组份10含盐干粉160mg, Sephadex G-75柱(1.6×120cm), 每小时收集3管, 每管4ml

C: 组份11含盐干粉115mg, Sephadex G-75柱(1.6×120cm), 每小时收集3管, 每管4ml

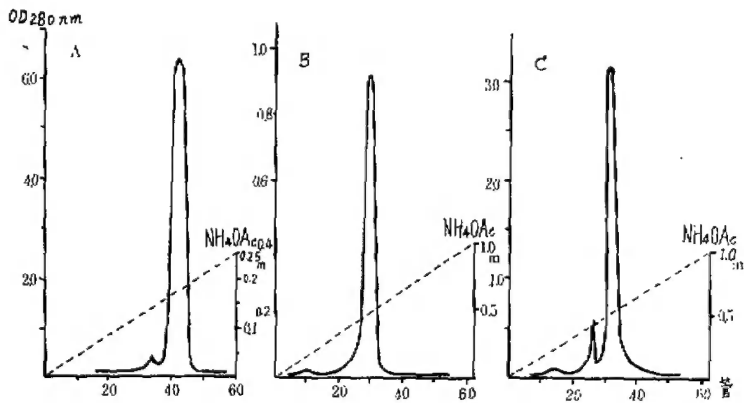


图3 银环蛇毒的三个组份在CM-Sephadex C-50柱上的重层析图

CM-Sephadex C-50柱大小为1.5×40cm, 醋酸铵缓冲液梯度洗脱, 每小时收4管, 每管4ml

A: 组份3经Sephadex G-50凝胶过滤后的主峰干粉150mg

B: 组份10经Sephadex G-75凝胶过滤后的主峰干粉17mg

C: 组份11经Sephadex G-75凝胶过滤后的主峰干粉50mg

这五个纯化组份的毒性大小和神经肌肉阻断的情况, 概要地用表2说明。

5. 提纯的组份3经上述九种酶活性测定, 都未测到明显的酶活性, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定纯度, 明示单一的区带, 说明提纯的组份3达到了电泳纯。免疫扩散试验, 组份3也只出现单一的抗原抗体复合物沉淀线。图5为提纯的组份3的聚丙烯酰胺电泳照片, 图6为提纯的组份3的免疫扩散的照片。

表 2 提纯的组份3、6、9、10和11的毒性和神经肌肉阻断作用

组 份	小鼠LD ₅₀ (腹腔注射) ($\mu\text{g/g}$)	小鸡颈二腹肌神经肌肉 完全阻断的时间 (分) (毒素浓度: $2\mu\text{g/ml}$)	完全阻断后肌肉对 乙酰胆碱($4\mu\text{g/ml}$) 的反应	毒 素 类 型
组 份 3	0.11 ± 0.02	10	不引起收缩	α
组 份 6	0.48 ± 0.05	24	不引起收缩	α
组 份 9	1.04 ± 0.10	22	引起收缩	β
组 份 10	0.094 ± 0.002	33	引起收缩	β
组 份 11	0.0078 ± 0.0002	28	引起收缩	β

* 组份3、10和11是经凝胶过滤和离子交换重层析提纯的, 组份6和9是经过凝胶过滤提纯, 而未经过离子交换重层析提纯的。

根据以上各种实验结果, 不难看出, 我们提纯的组份3就是Lee等人^[2]、Mebs等人^[3]和Clark等人^[8]所提纯的 α -银环蛇毒素(α -bungarotoxin)。

银环蛇毒中主要的 β -型毒素—组份10和11, 虽经我们用二次离子交换层析和凝胶过滤提纯, 但在聚丙烯酰胺凝胶电泳时为二条和二条以上区带, 对这个纯化组份的组成、纯度和活性有待进一步研究。

讨 论

银环蛇毒的组份十分复杂, 据Altman和Dittmer^[9]的资料记载, 含有18种酶和多种突触前和突触后神经毒素, 是一种重要的动物资源。从中提纯的 α -银环蛇毒素和 β -银环蛇毒素在神经生理学、生物化学和药理学(包括抗蛇毒血清)的研究上都非常重要的用途^[10]。特别是 α -银环蛇毒素与烟碱样乙酰胆碱受体的结合特别紧密, 已经成为乙酰胆碱受体研究的不可缺少的重要工具^[11]。由于银环蛇的排毒量很小, 根据广西医学院的资料^[12]每条银蛇一次排毒量平均为4.6mg, 而实际从养蛇场取毒往往还取不到此数量。因此银环蛇毒的来源比较困难, 蛇毒价格也较高, 提纯的 α -银环蛇毒素和 β -银环蛇毒素在国际市场上更是昂贵。银环蛇除在缅甸和印度支那有所分布外, 主要生产在我国的南方诸省(包括台湾省)。积极开发和利用银环蛇这一动物资源, 除搞好用幼蛇制取金钱白花蛇供药用外, 更应组织对其蛇毒的研究和利用, 生产 α -银环蛇毒素和 β -银环蛇毒素之类重要产品供应国内外需要, 便可充分利用资源, 创造财富。本文报导的内容为此提供了依据和方法。

我们采用的CM-Sephadex C-50柱层析分离银环蛇毒的条件与Lee、Mebs、Dryden等^[2-4]有所不同, 在低盐浓度洗脱部份的分离效果比他们的好些, 即 α -型毒素所在部份分出的峰数较多些。我们的分离图谱中 α -银环蛇毒素(即组份3)和主要的 β -毒素(即组份10、11和9)的洗脱位置和峰形都很接近国外诸家的图形。

Ginsborg和Warriner^[6]建立的用小鸡颈二腹肌神经肌肉标本进行的神经肌肉阻断试验, 是鉴别神经毒素及其作用部位的重要方法, 且比较灵敏。我们用此方法测定分离

组份的阻断特性,其结果与Lee等人的报导很接近。虽然我们用经典的等张横杆描记于烟鼓,在许多次实验中终于获得较好的图形。 α -型毒素是由于它与突触后膜乙酰胆碱受体的紧密结合,阻止了受体与乙酰胆碱的结合,从而造成了一种抗去极化型神经肌肉阻断作用,这种 α -型毒素并不影响乙酰胆碱的合成与释放。因此,在 α -型毒素产生的神经肌肉阻断后,外加乙酰胆碱也不能引起肌肉收缩。 β -型毒素却不与突触后膜乙酰胆碱受体结合,而是抑制突触前的乙酰胆碱的合成与释放,造成乙酰胆碱的耗竭,从而阻断神经传导。此时,若加入外源性乙酰胆碱即可引起肌肉收缩。我们从小鸡颈二腹肌阻断试验中可以清楚地区分这二种类型的毒素。

对13个分离组份的酶活力分布测定,其结果与Lee等人[2]的结果一致。值得注意的是磷酸酶A的分布,从我们的实验看出银环蛇毒的磷酸酶A分布在 α -型毒素所在的位置,集中在 α -银环蛇毒素所在的组份3上,此酶活性可在凝胶过滤和CM-Sephadex C-50重层析中完全除去,提纯的组份3(α -银环蛇毒素)用间接溶血法测定不到磷酸酶的活性。 β -型毒素所在的组份和经过凝胶过滤和CM-Sephadex C-50重层析提纯的组份10和11,我们均未测到明显的磷酸酶A的活性,此结果与Lee等人[2]、Sen等人[13]、Renald和Howard(1977)的实验结果相一致,但Werchicke等人[14]、Strong等人[15]和Tobias[16]等人却报告 β -银环蛇毒素具有磷酸酶A的活性。究竟真相如何,尚待进一步研究,我们准备在下一步就 β -银环蛇毒素的毒性与磷酸酶A的活性等方面进行研究与探讨。

用本文报道的方法提纯的 α -银环蛇毒素,其毒性和神经肌肉阻断时间都和文献报道的数值相近,且无九种酶的活性,聚丙烯酰胺凝胶电泳呈现单一区带,说明我们提纯的 α -银环蛇毒素已达到生理、生化和药物学研究要求的纯度标准。

参 考 文 献

- [1] Chang, C.C. & Lee, C.Y. Isolation of neurotoxins from the venom of *Bungarus multineatus* and their mode of neuromuscular blocking action. *Arch. int. pharmacodyn.* 1963, 144, 241.
- [2] Lee, C.Y. et al. Chromatographic separation of the venom of *Bungarus multineatus* and characterization of its components. *Chromatography*, 1972, 72, 71.
- [3] Mebs, D. et al. purification, properties and amino acid sequence of β -bungarotoxin from the venom of *Bungarus multineatus*. *Hope Seylers Z. Physiol. Chem.* 1972, 353, 243.
- [4] Dryden, W.F. et al. Pharmacological studies on the bungarotoxin. Separation of the fractions and their neuromuscular activities. *Europ. J. Pharmacol.*, 1974, 26, 256.
- [5] 涂光传等:我国几种常见毒蛇的蛇毒酶活力测定。生物化学与生物物理学报, 1976, 8 151.
- [6] Ginsborg, B.L. & Warriner, J. The isolated chick biventer cervicis neuromuscle preparation. *Brit. J. Pharmacol.*, 1960, 15, 410.
- [7] 张昌绍、张毅主编:药理学, 1965, 1, 329. 人民卫生出版社.
- [8] Clark, D.G. et al. Purification, characterization, and immunochemical studies of α -bungarotoxin. *Biochemistry*, 1972, 11, 1663.
- [9] Altman, P.L. & Dittmer, D. *Biology data book*, Second Edition, 1973, 3. 711, By Federation of American Societies for Experimental Biology.
- [10] 朱培国:银环蛇神经毒素的作用原理及其在神经科学中的应用。第一次蛇毒研究与利用讨论会资料(昆

- 明), 1978.
- [11] 陈式耀: α -银环蛇毒与烟碱样乙酰胆碱受体的研究。生理科学进展, 1980, 11 (4), 296.
- [12] 广西医学院: 治疗蛇伤及蛇毒研究资料汇编。1966, 文 6.
- [13] Sen, I. et al., Mechanism of action of β -bungarotoxin on synaptosomal preparations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1976, 73, 2664.
- [14] Werricke, J. et al., The mechanism of action of β -bungarotoxin. *J. Neurochem.*, 1975, 25, 483.
- [15] Strong, P.N. et al., β -Bungarotoxin, a presynaptic toxin With enzymatic activity. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1976, 73, 178.
- [16] Tobias, G.S. et al., β -Bungarotoxin, Relationship of phospholipase activity to toxicity. *Fed. Proc.* 1976, 35, 800.

CHROMATOGRAPHIC FRACTIONATION OF *BUNGARUS MULTICINCTUS* VENOM, ACTIVITIES DETERMINATION OF SOME FRACTIONS AND PURIFICATION OF α -BUNGAROTOXIN

Gong Chao-liang Sun Xin He Qi-wei
(Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)

Xue Tao-yan Li Shu-yan Zhao Yan-de
(Department of pharmacology, Guangzhou Medical College)

Abstract

It is reported in this paper that the *Bungarus multicinctus* venom from Guangdong Province has been fractionated on CM-Sephadex C-50 into thirteen fractions. Distribution of nine enzymes are determined in the thirteen fractions and neuromuscular blocking action and LD_{50} of mice (ip) are assayed in five main toxic fractions. Experiment on the neuromuscular blocking action of chick biventer cervicis muscle showed that fraction 3 and 6 exhibited the property of postsynaptic neurotoxin (α -type), fraction 9, 10 and 11 contained presynaptic neurotoxin (β -type), as judged from the acetylcholine response of the chick muscle after neuromuscular blockade. Further purification of the fraction 3 by gel filtration on Sephadex G-50 and rechromatography on CM-Sephadex C-50, purified α -bungarotoxin is obtained. It showed a single band on polyacrylamide gel electrophoresis at pH 4.5.